

孙瑞萍,魏立民,晁哲,等. 封闭群五指山小型猪 33 个微卫星位点的遗传分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):164-169.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.041

封闭群五指山小型猪 33 个微卫星位点的遗传分析

孙瑞萍^{1,2}, 魏立民¹, 晁哲^{1,2}, 刘海隆^{1,2}, 郑心力¹, 刘国炜^{1,2}, 黄丽丽¹, 邢漫萍¹, 王峰^{1,2}

(1. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海南海口 571100; 2. 海南省热带动物繁育与疫病控制重点实验室, 海南海口 571100)

摘要:依据北京市地方标准 DB11/T828.3—2011《实验用小型猪 第 3 部分:遗传质量控制》,在 DNA 水平上对封闭群五指山小型猪进行种群遗传分析。通过利用多重 PCR 和基因扫描技术对封闭群五指山猪 33 微卫星位点进行遗传检测,统计各个基因座的杂合度及期望杂合度、有效等位基因数、多态信息含量、固定指数和 Shannon 信息熵。结果表明,33 个微卫星位点在 WZSP 封闭群中平均等位基因数为 6.42,平均杂合度为 0.66,期望杂合度平均值为 0.69。此外,总群体在 33 个位点多态信息含量的平均值为 0.65,平均固定指数为 0.05。说明封闭群五指山小型猪群体具有一定的遗传稳定性,符合封闭群动物的遗传结构特征,所选微卫星位点可用于五指山小型猪遗传多样性评估。

关键词:微卫星;五指山小型猪;封闭群;多态性;遗传检测;杂合度

中图分类号:S828.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0164-05

五指山猪是我国非常著名的小型猪品种,在原产地海南省处于长期的封闭群体,具有体型小、遗传稳定、抗逆性、适应性强等特点,同时也与我国其他品系的小型猪一样^[1],在器官大小、生理特性、疾病发生机制等方面与人类接近,作为人类试验模型的首选动物之一,已被应用于生命科学基础研究的多种领域^[2]。冯书堂等原中国农业科学院畜牧研究所科研人员于 1989 年将五指山猪从原产地引进后,采用异地近交繁育,已培育出 F₂₂近交系,并进行大量的基础研究和开发应用证明了五指山猪是人类理想的“替难者”^[3]。潘金春等将五指山猪引种到广东广州后进行了异地培育,建立了封闭群和近交系,并做了大量的基础工作证明五指山猪是一种很好的试验动物模型^[4-8]。海南省农业科学院畜牧兽医研究所于 1998 年自原产地引种五指山猪后将其集中饲养在海南省海口市郊区灵山镇五指山猪种猪场按照封闭群繁育标准自闭繁殖近 20 年^[9]。2014 年 7 月 11 日,海口市郊区灵山镇五指山猪种猪场获得海南省科学技术厅颁发的试验动物生产许可证,许可证号为 SCXK(琼)2014-0006。

五指山小型猪的遗传质量对其作为研究对象进行医学生物学研究时结果的准确性、重复性、科学性有重要影响,但目前我国还没有建立试验用小型猪遗传质量标准,仅于 2012 年 3 月北京市应用微卫星标记技术针对小型猪遗传质量控制出台了地方标准 DB11/T828.3—2011《实验用小型猪 第 3 部分:遗传质量控制》。微卫星(microsatellite)是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,其核心通常由 2~6 个核苷

酸的串联重复片段构成。由于该技术具有数量丰富、分布广、共显性遗传等特点目前应用非常广泛^[10]。而利用美国应用生物系统公司提供的遗传分析仪对荧光标记的 DNA 片段进行检测,结合分子量内标进行 DNA 片段长度计算,使 STR 分型变得高效快捷,结果也更加精确,已经在基因定位、种质鉴定、遗传多样性分析、遗传图谱构建等方面得到广泛应用^[11-12]。本研究依据 DB11/T828.3—2011《实验用小型猪 第 3 部分:遗传质量控制》和参考文献[13-14]选用 33 个微卫星位点,通过对封闭群五指山小型猪进行遗传多态性分析,为该群体的遗传质量评价和今后遗传育种方向提供参考资料。同时也为五指山猪的种质资源保护、选育和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

从海南省国家级五指山猪保种场永发基地试验动物繁育场[生产许可证号 SCXK(琼)2014-0006]采集 60 份耳皮肤组织样,样本置于 1.5 mL 消毒离心管中,带回实验室,置于 -20℃ 冰箱中保存备用。该品种在繁育场按照随机交配原则进行封闭繁育近 20 年,已繁育至 3 代以上。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR Buffer (Mg²⁺)、dNTP (10 mmol/L)、marker、6 × DNA Loading Dye [生工生物工程(上海)股份有限公司];HIDI、LIZ500 (美国应用生物系统公司)。

1.3 DNA 的提取

五指山猪基因组 DNA 按照天根生化科技(北京)有限公司 DNA 提取试剂盒中的方法提取,溶于 Tris-EDTA (TE)缓冲液中,于 -20℃ 条件下保存。用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 双重检测 DNA 的纯度和浓度。

本试验选择的 33 对微卫星引物及荧光标记全部参照^[13-14],均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。合成的 33 个微卫星标记引物进行多重 PCR 扩增。PCR 反应体

收稿日期:2017-06-26

基金项目:海南省省属科研院所技术开发研究专项(编号:KYYS-2015-02、琼科[2016]31 号);海南省农业科学院农业科技创新专项(编号:cxzx201607);国家自然科学基金(编号:31560628)。

作者简介:孙瑞萍(1982—),女,山西运城人,博士,副研究员,研究方向为家畜遗传育种与繁殖。E-mail:ruiping937@126.com。

通信作者:王峰,研究员,研究方向为家畜遗传育种。E-mail:wfweng73cn@126.com。

系为 20 μ L, 1.0 μ L DNA 模板、2.5 μ L *Taq* Buffer、0.5 μ L dNTP 10 mmol/L、0.5 μ L 上有引物、0.5 μ L 下游引物、0.5 μ L *Taq* DNA 聚合酶,最后补 H_2O 至 20 μ L。反应条件如表 1。

表 1 PCR 反应条件

步骤	反应条件	反应温度 ($^{\circ}C$)	反应时间	循环
1	预变性	95	3 min	
2	变性	95	30 s	步骤 2~4 共 10 个循环
3	退火	60	30 s	
4	延伸	72	30 s	
5	变性	95	30 s	步骤 5~7 共 20 个循环
6	退火	55	30 s	
7	延伸	72	30 s	
8	修复延伸	72	6 min	

1.4 微卫星基因扫描

将多重 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因扫描,使用的测序仪为 ABI3730XL,使用 Genemapper 软件分析 SSR 数据,标定片段大小和基因型。

1.5 数据统计与分析

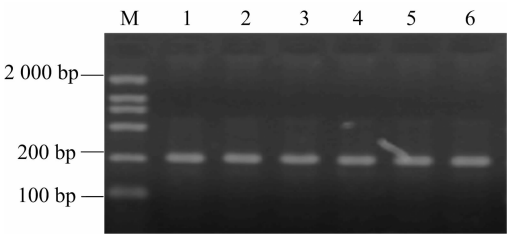
运用 Popgene 32 软件对数据进行统计分析,首先将所有样本的每个微卫星位点的基因型以 ab、bb 等形式输入

Popgene32 软件的数据文件,然后计算样品在各个微卫星位点上的基因型频率(genotypic frequency)、等位基因频率(allele frequency)、有效等位基因数(N_e)、香隆指数(Shannon index)、纯合度(H_o)、杂合度(H_e)等。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物检测

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,部分结果如图 1 所示。PCR 产物在 ABI3730XL Genetic Analyzer 测序后 STR 分型如图 2 所示。各峰图表示封闭群五指山猪微卫星基因座等位基因的大小及基因型。



1~6—不同样本的 PCR 产物; M—DL2000 的 marker

图 1 微卫星 PCR 扩增产物 Sw902 琼脂糖凝胶电泳

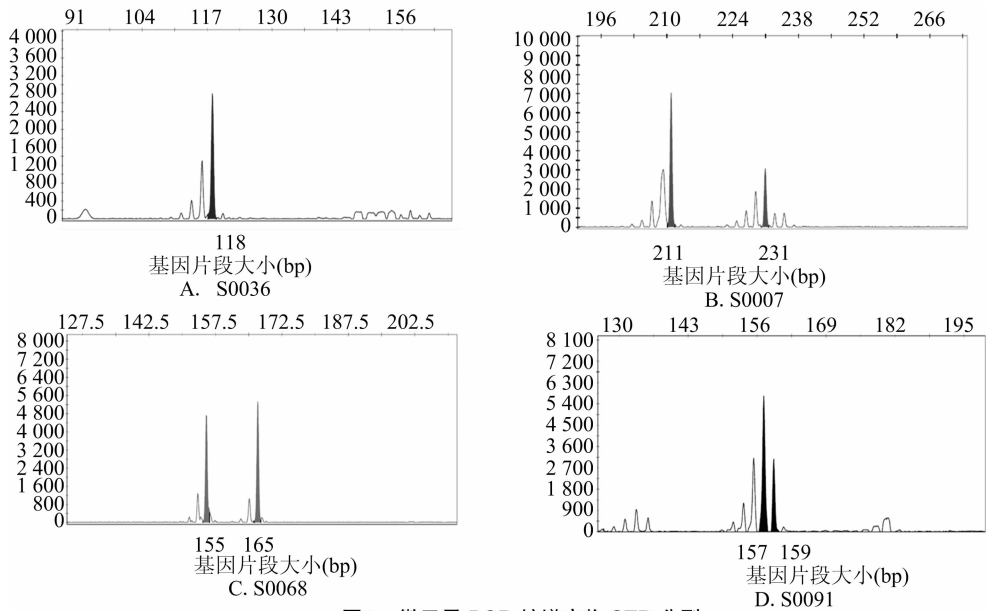


图 2 微卫星 PCR 扩增产物 STR 分型

2.2 等位基因频率及其等位基因分布

由表 2 可知,所检测的 33 个微卫星位点在 60 头封闭群五指山猪上共检测到 212 个等位基因,平均每个微卫星位点 6.42 个等位基因。其中,在 SWR158 位点上检测到等位基因数量最多,为 12 个,等位基因的变异范围为 164~216 bp,等位基因频率最高的是在 170 bp 处,为 0.366 7;而有 3 个位点(SW857、SW936、SW1374 位点)检测到等位基因数较少,仅为 4 个;33 个微卫星位点的等位基因频率高低不均,每个基因位点除几个等位基因频率较高外,其他等位基因频率较低(表 3)。这些结果表明,封闭群五指山猪在 33 个微卫星位点上存在基因多态性,可用于后续五指山猪遗传特性分析。

2.3 五指山猪封闭群的群体遗传变异分析

由表 4 可知,33 个微卫星位点在 WZSP 封闭群中平均纯合度最低值与最高值分别为 0.10、0.82,平均值为 0.34;平均杂合度为 0.22~0.90,平均为 0.63。期望纯合度最低值与最高值分别为 0.16、0.69;期望杂合度最低值与最高值分别为 0.31、0.84,其平均值为 0.66。此外,总群体在 33 个位点多态信息含量的平均值为 0.65,29 个位点呈高度多态性。在 33 个位点中,16 个位点固定指数为负值,其他位点均为正值,平均固定指数为 0.05;在 33 个微卫星位点中,SW886 位点的杂合度、期望杂合度、多态信息含量和 Shannon 信息熵均最高,该位点具有最为丰富的多态性。

表 2 封闭群五指山猪 33 个微卫星位点等位基因数、有效等位基因数、大小、最高频率等位基因及其频率

位点	等位基因数(个)	有效等位基因数(个)	等位基因大小(bp)		最高频率等位基因	
			最小	最大	位置(bp)	频率
OPEN	8	3.63	138	168	138	0.466 7
S0005	7	5.28	205	253	205	0.300 0
S0007	5	2.74	155	183	155	0.525 0
S0036	6	4.37	118	130	118	0.333 3
S0062	8	5.02	142	188	146	0.283 3
S0068	7	3.42	211	251	211	0.483 3
S0070	6	2.87	273	289	279	0.525 0
S0091	7	3.23	149	167	157	0.491 7
S0218	9	3.91	169	201	169	0.450 0
SW2	6	3.22	92	112	97	0.400 0
SW29	6	2.82	131	165	131	0.533 3
SW61	8	3.51	230	261	239	0.383 3
SW81	5	3.14	125	139	137	0.475 0
SW205	5	2.21	145	155	151	0.608 3
SW240	6	3.66	92	114	92	0.375 0
SW271	8	5.34	109	143	135	0.316 7
SW787	6	3.56	145	161	157	0.458 3
SW857	4	3.80	92	155	139	0.316 7
SW886	7	6.00	144	174	168	0.216 7
SW902	6	2.74	190	214	190	0.525 0
SW911	6	1.45	149	175	155	0.825 0
SW919	7	5.59	97	135	117	0.258 3
SW936	4	2.85	91	109	109	0.525 4
SW974	5	3.58	106	136	108	0.400 0
SW1066	9	5.33	174	212	198	0.341 7
SW1089	4	2.40	167	189	167	0.575 0
SW1092	7	1.73	230	310	238	0.750 0
SW1119	5	4.17	158	182	178	0.347 5
SW1374	4	1.80	203	211	209	0.725 0
SW2409	5	2.24	81	91	85	0.627 1
SWR158	12	5.44	164	216	170	0.366 7
SWR1008	9	3.92	199	257	205	0.408 3
SWR1120	5	4.32	146	160	158	0.333 3
均值	6.42	3.61				
总计	212	119.29				

3 讨论与结论

五指山小型猪目前已广泛应用于肿瘤、心血管、糖尿病、皮肤烧伤、新药安全性评价等生物医学研究的诸多领域,由于猪的质量问题已直接影响到医学生物学研究结果的准确性,而遗传监测是评定和保证小型猪群体遗传质量的有效措施。然而,目前国内外应用微卫星对小型猪群体遗传进行分析所应用的微卫星位点非常不统一,而且有些微卫星位点多态性也较差,因此建立遗传检测方法的关键就是选择合适的微卫星位点及数量。欧江涛等利用多重 PCR 和基因扫描技术对笔者所在单位五指山猪保种场五指山猪核心群的 32 个微卫星基因座进行遗传检测,结果发现,32 基因座的平均等位基因数为 9.410 个,平均 PIC 为 0.708,平均杂合度为 0.558^[15]。其中,SW184 9 最多为 17 个,而 SW25 最少为 2 个。而黄礼光等同样利用 STR 技术对笔者所在单位五指山猪保种场 13 个

家系的 32 个微卫星基因座进行遗传检测,结果发现,各家系 32 基因座的平均等位基因数为 13.66 个,平均 PIC 为 0.731,平均杂合度为 0.559,SW1849 与 SW268 最多为 26 个,而 SW255 最少为 3 个^[16]。袁文等以在广州异地保种选育的五指山猪封闭群为研究对象,选取 26 个微卫星位点分析了其等位基因组成(*N*)、杂合度(*H*)及其多态信息含量(PIC),结果发现,26 个微卫星位点平均分别为 9.41、0.558、0.742^[17]。Barker 曾提出用于群体遗传学检测的微卫星数量不应低于 26 个,而且彼此不连锁和每个标记至少有 4 个等位基因才能使结果具有一定的准确性^[18]。在本试验中采集 60 头五指山猪的组织样,并且检测 33 个小型猪微卫星位点,结果发现等位基因数平均在 6.17 个,符合 Barker 提出的原则^[18]。但是较之前黄礼光等检测到的平均等位基因明显减少^[16],究其原因认为可能原来的所选位点中占较高等位基因数的最高值与最小值相差较大,等位基因在群体中分布不均匀而导致的平均等位基因较高,而在本研究中 33 个位点最低与最高有效等位基因数分别为 1.45、6.0,平均有效等位基因为 3.61,相对原来五指山猪其他 32 个位点分布较均匀^[19]。但位点 SWR158 的有效等位基因数和等位基因数的绝对数相差最大,为 6.56,明显低于其他位点,表明在该位点上等位基因分布较不均匀。由此推测,五指山猪长期定向选育的过程中,微卫星位点 SWR158 受到了更大的选择压力,造成其等位基因分布不均匀。此外,本研究选取的 33 个微卫星位点检测到的所有等位基因中出现的最高频率为 82.50%,远低于 95%,说明这些微卫星位点在五指山小型猪封闭群群体中多态性比较丰富^[20-21],同时也从另一侧面说明这些位点是该五指山猪中最原始、保守的位点。

平均杂合度和遗传标记所含的信息量(PIC)均能反映 DNA 多态性程度^[22]。在判断一个群体是否为合格的封闭群试验用小型猪时,地方标准 DB11/T 828.3—2011《实验用小型猪 第 3 部分:遗传质量控制》认为的平均杂合度在 0.5~0.7,符合合格的封闭群试验用小型猪群体的遗传标准。魏杰等利用该标准中的 25 对微卫星引物对北京地区 3 个中国农业大学小型猪亚系群体进行微卫星分型,结果发现,农大 I 系、农大 II 系、农大 III 系小型猪群体平均杂合度分别为 0.675 9、0.596 7、0.677 9,均符合封闭群动物的群体遗传特征^[23]。而房山封闭群小型猪 25 对引物中仅 21 对引物得以稳定扩增;平均多态性信息含量和平均杂合度分别为 0.463 0、0.533 1,而 SWR1008 与标准中有所差异,结果表明房山封闭群小型猪群体虽然从多态性方面符合封闭群动物的遗传结构特征,但也证明了地方标准有些本研究所选用的微卫星位点得到平均杂合度为 0.66,29 个位点 PIC 均大于 0.50,平均 PIC 为 0.65,属于高度多态,试验研究结果比原五指山小型猪核心群和近交系多态性信息含量丰富^[3,16],与同时也优于房山封闭群小型猪和广西巴马小型猪近交系^[14,24]。较以往研究更符合封闭群的特征,这也充分反映了五指山猪封闭群小型猪在长期封闭培育过程中群体基因频率已趋于稳定,已基本形成一个新的封闭群,可作为理想选择标记的微卫星位点,其 PIC 值应大于 0.7;在一个群体中,某位点 PIC 越大,其杂合子比例则越高,提供的遗传信息就越多,选择潜力也越大。此研究分析中有 33 个微卫星位点标记都

表 3 封闭群五指山猪 33 个微卫星位点的等位基因频率

位点	各基因型的等位基因频率											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
OPEN	0.467	0.100	0.175	0.067	0.042	0.025	0.100	0.025				
S0005	0.300	0.150	0.092	0.200	0.150	0.050	0.058	0.017				
S0007	0.525	0.025	0.258	0.142	0.050	0.075	0.067					
S0036	0.333	0.175	0.250	0.133	0.033	0.025	0.025					
S0062	0.275	0.100	0.283	0.133	0.100	0.075	0.208					
S0068	0.483	0.067	0.133	0.167	0.050	0.050						
S0070	0.242	0.067	0.075	0.525	0.042	0.067						
S0091	0.025	0.125	0.050	0.492	0.033							
S0218	0.450	0.058	0.142	0.067	0.125	0.017	0.050	0.083	0.008			
SW2	0.400	0.042	0.058	0.100	0.367	0.033						
SW29	0.533	0.233	0.050	0.033	0.058	0.092						
SW61	0.017	0.383	0.017	0.342	0.125	0.033	0.058	0.025				
SW81	0.125	0.233	0.017	0.475	0.150							
SW205	0.033	0.017	0.608	0.067	0.275							
SW240	0.375	0.275	0.017	0.058	0.225	0.050						
SW271	0.092	0.008	0.100	0.175	0.317	0.167	0.075	0.067				
SW787	0.067	0.075	0.117	0.458	0.200	0.083						
SW857	0.317	0.158	0.258	0.267								
SW886	0.125	0.117	0.192	0.217	0.025	0.175	0.150					
SW902	0.525	0.042	0.283	0.050	0.042	0.058						
SW911	0.033	0.825	0.042	0.008	0.075	0.017						
SW919	0.117	0.092	0.208	0.192	0.258	0.092	0.042					
SW936	0.170	0.144		0.161	0.525							
SW974	0.225	0.400	0.133	0.225	0.017							
SW1066	0.042	0.067	0.158	0.042	0.342	0.058	0.083	0.050	0.158			
SW1089	0.575	0.167	0.017	0.242								
SW1092	0.017	0.750	0.108	0.042	0.042	0.017	0.025					
SW1119	0.212	0.068	0.348	0.186	0.186							
SW1374	0.150	0.050	0.725	0.075								
SW2409	0.195	0.627	0.102	0.009	0.068							
SWR158	0.050	0.117	0.367	0.067	0.017	0.083	0.033	0.117	0.033	0.025	0.067	0.025
SWR1008	0.025	0.008	0.408	0.050	0.258	0.083	0.083	0.067	0.017			
SWR1120	0.225	0.108	0.133	0.333	0.200							

可作为候选遗传标记进行连锁分析,并且位点 SW886 的多态信息含量最高,为 0.81,表明五指山猪封闭群在该位点的遗传信息更为丰富,相比其他位点则具有更大的选择潜力。

在目前对封闭群和近交系小型猪进行遗传变异分析中,大多作者都仅选用等位基因频率、平均杂合度和多态信息含量这几个遗传指标^[25-27]。但研究表明,Shannon 表型多样性指数可以评价种群内和种群间遗传多样性的高低,指数越大表明种群的遗传多样性越高^[28]。而 Shannon 信息熵一般在 1.5~3.5 之间变化,很少超过 4.5^[29]。此研究中 33 个微卫星位点 Shannon 信息熵均分布在 0.71~2.07 之间,表明 WZSP 封闭群群体在一些位点存在遗传多样性贫瘠。此外,固定指数是通过杂合子频率偏差反映群体在某个位点的遗传分化程度了解种内的遗传结构重要参数。在本研究的 33 个位点中,21 个位点均为正值,12 个位点固定指数为负值,平均固定指数为 0.05,这表明五指山小型猪封闭群群体处于杂合度缺失状态,群体中可能存在不同程度的近亲交配现象。这个结果表明这 2 个遗传指标的数据也从另一方面反映了仅选用等位基因频率、平均杂合度和多态信息含量这几个遗传指

标存在一定的不足。综上在 33 个微卫星位点中也发现,在 SW886 位点的杂合度、期望杂合度、多态信息含量和 Shannon 信息熵均最高,说明 WZSP 封闭群在该位点具有最为丰富的多样性。以后在对五指山猪的人工定向选育的过程中仍须要加大引入更多的外血,增强基因之间交流,从而选育出更为优良的品种,同时进行遗传变异分析时应选择更多的遗传指标进行综合分析。

参考文献:

[1]杨公社,张浩卫,白 亮,等. 猪——研究肥胖和糖尿病的理想模式动物[J]. 自然科学进展,2008,18(5):481-487.
[2]田玉龙,钟红珊. 五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用[J]. 介入放射学杂志,2016,25(4):363-366.
[3]冯书堂,李 奎,牟玉莲,等. 五指山小型猪近交系培育与遗传资源创新[J]. 农业生物技术学报,2012,20(8):849-857.
[4]潘金春,闵凡贵,袁 文,等. 五指山小型猪下颌骨的测量及分析[J]. 中国实验动物学报,2010,18(2):136-141,后插 4.
[5]闵凡贵,王希龙,袁 文,等. 封闭群五指山小型猪血液生理生化指标的测定[J]. 中国实验动物学报,2008,16(5):372-375.

表 4 WZSP 封闭群 33 个微卫星位点的遗传多样性指标

位点	平均纯合度	平均杂合度	期望纯合度	期望杂合度	固定指数	Shannon 指数	多态信息含量
OPEN	0.32	0.68	0.27	0.73	0.060	1.62	0.70
S0005	0.10	0.90	0.18	0.82	-0.110	1.79	0.79
S0007	0.33	0.67	0.36	0.64	-0.050	1.21	0.58
S0036	0.20	0.80	0.22	0.78	-0.040	1.59	0.74
S0062	0.12	0.88	0.19	0.81	-0.100	1.78	0.77
S0068	0.33	0.67	0.29	0.71	0.060	1.54	0.68
S0070	0.32	0.68	0.34	0.66	-0.050	1.34	0.61
S0091	0.33	0.67	0.30	0.70	0.030	1.47	0.66
S0218	0.65	0.35	0.25	0.75	0.530	1.71	0.72
SW2	0.32	0.68	0.30	0.70	0.010	1.38	0.64
SW29	0.35	0.65	0.35	0.65	-0.010	1.32	0.6
SW61	0.30	0.70	0.28	0.72	0.020	1.50	0.67
SW81	0.82	0.18	0.31	0.69	0.730	1.31	0.63
SW205	0.40	0.60	0.45	0.55	-0.090	1.02	0.49
SW240	0.35	0.65	0.27	0.73	0.110	1.44	0.68
SW271	0.15	0.85	0.18	0.82	-0.050	1.83	0.79
SW787	0.23	0.77	0.27	0.73	-0.070	1.51	0.69
SW857	0.13	0.87	0.26	0.74	-0.180	1.36	0.69
SW886	0.13	0.87	0.16	0.84	-0.040	1.84	0.81
SW902	0.22	0.78	0.36	0.64	-0.230	1.28	0.58
SW911	0.78	0.22	0.69	0.31	0.300	0.71	0.30
SW919	0.18	0.82	0.17	0.83	0.010	1.81	0.80
SW936	0.47	0.53	0.35	0.65	0.190	1.21	0.60
SW974	0.30	0.70	0.27	0.73	0.030	1.37	0.67
SW1066	0.37	0.63	0.18	0.82	0.220	1.92	0.79
SW1089	0.52	0.48	0.41	0.59	0.180	1.03	0.52
SW1092	0.72	0.28	0.58	0.42	0.330	0.95	0.40
SW1119	0.24	0.76	0.23	0.77	-0.003	1.50	0.72
SW1374	0.52	0.48	0.55	0.45	-0.090	0.86	0.41
SW2409	0.46	0.54	0.44	0.56	0.020	1.07	0.51
SWR158	0.13	0.87	0.18	0.82	-0.060	2.07	0.80
SWR1008	0.28	0.72	0.25	0.75	0.040	1.66	0.71
SWR1120	0.13	0.87	0.22	0.78	-0.130	1.53	0.73
均值	0.34	0.66	0.31	0.69	0.050	1.44	0.65

[6] 闵凡贵,潘金春,袁 文,等. 封闭群五指山小型猪主要繁殖性状的多重回归与通径分析[J]. 中国畜牧兽医,2011(12):145-148.

[7] 闵凡贵,潘金春,袁 文,等. 两种方法测定封闭群五指山小型猪下颌骨参数比较[J]. 家畜生态学报,2010,31(2):21-24.

[8] 闵凡贵,潘金春,王希龙,等. 影响五指山小型猪主要脏器重量及脏器系数的因素分析[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(10):218-222.

[9] 孙瑞萍,魏立民,晁 哲,等. 海南原产地五指山猪资源保护与开发利用[J]. 养猪,2015(3):73-75.

[10] Kim T L, Kimt K S, Choi B H, et al. Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis[J]. Journal of Animal Science, 2005(10):2255-2263.

[11] Fabuel E, Barragán C, Silió L, et al. Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers[J]. Heredity, 2004, 93(1):104-113.

[12] Cortés O, Martínez A M, Cañon J, et al. Conservation priorities of Iberoamerican pig breeds and their ancestors based on microsatellite information[J]. Heredity, 2016, 117(1):14-24.

[13] 徐玲玲,吴艳花,路 静,等. 筛选适用于小型猪遗传检测的微卫星位点[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(2):11-16.

[14] 魏 杰,王吉星,王 洪,等. 房山封闭群小型猪微卫星位点的测定[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(11):7-12.

[15] 欧江涛,黄礼光,王希龙,等. 五指山猪核心群 32 个微卫星基因座的遗传学分析[C]. 全国首届动物生物技术学术研讨会论文集,2004.

[16] 黄礼光,王希龙,欧江涛,等. 应用多重 PCR 和基因扫描技术对五指山猪 13 个家系 32 个微卫星基因座的遗传分析[J]. 遗传, 2005, 27(1):70-74.

[17] 袁 文,王 静,罗琴芳,等. 五指山猪封闭群和近交群的微卫星遗传分析[C]. 第十二次全国畜禽遗传标记研讨会论文集,2010.

[18] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds[C]. Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1994, 21: 501-508.

[19] 野 泽,谦,常 洪,等. 驯化对动物群体变异水平的影响[J]. 畜牧兽医杂志,1997(2):53-55.

[20] 王洪程,咎林森,宋付标,等. 秦川牛微卫星基因位点遗传多样性分析[J]. 中国农学通报,2011,27(11):10-14.

伍革民, 张 继, 唐继高. 4 个贵州乌骨鸡群体遗传关系的微卫星标记分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 169–171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.042

4 个贵州乌骨鸡群体遗传关系的微卫星标记分析

伍革民¹, 张 继², 唐继高¹

(1. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州大学动物科学学院, 贵州贵阳 550000)

摘要:利用 7 个微卫星标记对贵州 4 个乌骨鸡(普安乌骨鸡、赤水乌骨鸡、水西乌骨鸡、广西乌骨鸡)群体进行群体内遗传结构和群体间遗传距离的检测和分析。结果表明, 4 个乌骨鸡群体多态信息含量在 0.643 1~0.691 3, 杂合度在 0.706 9~0.738 5, 4 个乌骨鸡群体中杂合度最高的是广西乌骨鸡, 杂合度最低的是水西乌骨鸡。采用 PopGen 3.2 软件分析 4 个乌骨鸡群体的 Nei 氏遗传距离和遗传一致度, 构建系统发生树, 结果表明, 普安乌骨鸡聚为一类, 水西乌骨鸡聚为一类, 赤水乌骨鸡和广西乌骨鸡聚为一类。

关键词:乌骨鸡; 遗传多样性; 微卫星; 遗传距离; 系统发生树

中图分类号:S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)21-0169-03

贵州省地方鸡种资源丰富, 其中赤水乌骨鸡等 7 个品种已编入《贵州省畜禽品种志》, 还有一些地方鸡种如普安乌骨鸡、水西乌骨鸡等群体尚未编入, 由于地理、环境等各种因素, 它们缺乏规模化饲养、品种资源保护利用和开发研究。普安县乌骨鸡主产于云贵高原中段的贵州省西南部乌蒙山区普安县新店乡等地, 历史上无记载, 是一种独特的乌骨鸡品种, 有黑羽、麻羽等羽色类型, 黑羽乌骨鸡基本是农户散养, 缺少专业化饲养和规模化养殖^[1]。水西乌骨鸡主要产于贵州省黔西县新仁乡等地, 养殖历史较长, 该乌骨鸡体格健壮, 对疾病的抵抗能力强, 常年以青菜、统糠、稻谷等为食, 耐粗饲, 喜食山坡草籽、昆虫, 觅食能力强, 皮、骨、肉及内脏为乌色, 肉质鲜美。为充分开展这些地方鸡种资源的保护和利用, 有必要了解它们的遗传结构和亲缘关系。在应用于遗传结构或亲缘关系检测的多态性标记中, 微卫星标记数量多, 研究成熟、分布广、共显性、易于检测, 因而应用广泛。本研究选择 7 个微卫星标记对普安乌骨鸡、赤水乌骨鸡、水西乌骨鸡和广西乌骨鸡的遗传多样性进行检测, 并分析饲养于贵州省的 4 个乌骨鸡群体间的遗传关系, 可为这些品种或群体的开发利用奠定

基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用的 4 个鸡品种为普安乌骨鸡、赤水乌骨鸡、水西乌骨鸡和广西乌骨鸡, 其中普安乌骨鸡、赤水乌骨鸡和水西乌骨鸡是贵州省本地长期饲养和培育的地方鸡种, 广西乌骨鸡从广西壮族自治区东兰县引进, 后在贵州长期饲养。每个品种样本数为 30 羽, 采用翅下静脉采血 1.0~1.5 mL/羽, -20℃ 保存。

参考国内外文献报道^[2~7], 选择位点分布多的 7 对微卫星标记。引物位置、退火温度及序列等信息见表 1。

1.2 方法

采用血液 DNA 提取试剂盒提取 DNA。20 μL PCR 反应体系包括 2 × Taq PCR MasterMix 10 μL、引物各 1 μL、100 ng/μL 模板 DNA 1 μL、去离子水 7 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预热 3 min 后进行 35 个 PCR 循环, 然后 72℃ 延伸 5 min。35 个 PCR 循环参数包括 95℃ 变性 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 72℃ 延伸 30 s。1.0%~1.5% 琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增结果, 8%~10% 聚丙烯酰胺凝胶分离 PCR 产物, 银染显色和凝胶成像照相保存, 使用 Labworks 软件分析片段大小并进行分型。

1.3 数据统计分析

1.3.1 群体内遗传多样性分析 等位基因数、有效等位基因

[J]. 四川动物, 2010, 29(2): 281–284.

[26] 牛 荣, 黄中波, 商海涛, 等. 广西巴马小型猪 21 个微卫星座位的 DNA 多态性分析[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(8): 11–13.

[27] 付艳艳, 顾为望, 刘运忠, 等. 西藏小型猪线粒体 D-loop 区及微卫星多态性的遗传研究[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 318–321.

[28] 张民照. 用多态位点率和香农指数分析的飞蝗地理种群遗传多样性[J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 376–381.

[29] MaGuarran A. Ecological diversity and its measurement [M]. Princeton: Princeton University Press, 1988.

收稿日期: 2017-07-17

基金项目: 贵州省科技基金(编号: 黔科合 J 字[2014]2102 号); 贵州省农业科学院专项(编号: 黔农科院院专项[2014]006 号)。

作者简介: 伍革民(1972—), 男, 湖南新化人, 博士, 副研究员, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 68860531@qq.com。

[21] McLaren R J, Rogers G R, Davies K P, et al. Linkage mapping of wool keratin and keratin-associated protein genes in sheep[J]. Mammalian Genome, 1997, 8(12): 938–940.

[22] Strachan T, Read A P. Human molecular genetics[J]. Chromosome Research, 1996, 4: 475–475.

[23] 魏 杰, 巩 薇, 王 洪, 等. 北京中国农大小型猪三个亚系群体的遗传状况分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 50–55.

[24] 黄建芳, 李小楷, 蒋钦扬, 等. 广西巴马小型猪近交群体的遗传结构分析[J]. 中国畜牧兽医, 2015(2): 426–431.

[25] 于 冰, 刘若余. 贵州白香猪两品系微卫星座位的遗传分析